

Autores

Beatriz de A. Barros

Bióloga, Doutora em Genética e Melhoramento, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG beatriz@cnpmis.embrapa.br

Claudia Teixeira Guimarães

Engenheira Agrônoma, Doutora em Melhoramento Genético Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. claudia@cnpmis.embrapa.br (autor correspondente).

Estimativa do Número de Inserções de Transgenes em Milho por PCR Quantitativo (qPCR)

Introdução

O milho é um dos principais cereais produzidos no mundo, e o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, com uma estimativa para plantio de 13,3 milhões de ha e produção de 55,6 milhões de toneladas de grãos na safra 2010/11 (CONAB, 2011). As áreas de produção de milho concentram-se na região dos cerrados, que possuem solos originalmente ácidos, com presença de alumínio (Al) tóxico, principalmente nas camadas subsuperficiais. Assim, o desenvolvimento de genótipos adaptados a esses solos é uma importante estratégia para os programas de melhoramento genético de milho.

O principal mecanismo associado à tolerância ao alumínio em plantas consiste na exsudação de ácidos orgânicos pelo sistema radicular (MA et al., 2001) que formam complexos estáveis com o metal, anulando ou minimizando seus efeitos tóxicos. Em sorgo, Magalhães et al. (2004, 2007) mapearam e clonaram o gene de tolerância ao alumínio *Alt_{SB}*, que codifica um transportador de citrato do tipo MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), cuja expressão é induzida pela presença de Al nos ápices radiculares de genótipos tolerantes ao Al.

Buscando alcançar novos patamares de adaptação do milho ao cultivo em solos ácidos, a Embrapa Milho e Sorgo tem direcionado esforços na superexpressão do gene *Alt_{SB}* em milho via transgenia. Vários eventos transgênicos já foram obtidos por meio de biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*, tornando a sua caracterização molecular necessária para a seleção dos eventos-elites que apresentem uma cópia do gene de interesse. Eventos com inserção única são desejáveis, pois são geneticamente estáveis e são os alvos primários para a seleção de eventos-elites (GADALETA et al., 2011).

Tradicionalmente, essa caracterização tem sido feita utilizando *Southern blotting* (SOUTHERN, 1975). Essa técnica combina a transferência de fragmentos de DNA para uma membrana e a detecção daqueles de interesse por meio da hibridização com sondas marcadas. Como os fragmentos de DNA são obtidos pela digestão com enzimas de restrição e a sonda representa um fragmento do gene-alvo, o número de bandas pode ser associado ao número de cópias do transgene no genoma avaliado. Apesar de ser uma técnica robusta, é uma metodologia demorada e laboriosa, dificultando a análise de um grande número de eventos.

Recentemente, a metodologia de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) tem se apresentado como uma alternativa rápida, sensível e acurada para este tipo de análise. No entanto, os trabalhos que relatam a utilização do qPCR para esse fim baseiam-

se no método TaqMan®, que tem um alto custo pelo fato de utilizar combinações de *primers* e sondas marcadas, onerando a análise de um grande número de amostras, como é o caso do *screening* de eventos transgênicos. Uma alternativa de melhor custo-benefício para ensaios de qPCR seria o método SYBR Green®, uma molécula que se liga, com alta especificidade, à dupla fita do DNA. A fluorescência emitida pelo SYBR Green® é utilizada para detectar o acúmulo dos produtos de amplificação ao longo dos ciclos da reação de PCR, não necessitando de sondas específicas. Assim, a reação torna-se mais simples e os custos são significativamente reduzidos em comparação com o TaqMan®. Além disso, o fato de várias moléculas de SYBR® Green se ligarem a um mesmo fragmento aumenta a sensibilidade da detecção do ensaio.

O método SYBR® Green já havia sido proposto para a quantificação do número de cópias de transgenes por Song et al. (2002), mas por meio do estabelecimento de uma curva padrão. Essa curva deve ser estabelecida para cada experimento e requer pelo menos três amostragens com diferentes diluições do DNA-alvo para cada evento, aumentando os custos e dificultando a operacionalização das análises em larga escala.

Assim, o objetivo deste trabalho é apresentar uma metodologia mais simples e eficiente para estimar o número de inserções de transgenes combinando PCR quantitativo com a fluorescência SYBR® Green e o método de quantificação relativa por $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Metodologia

Material Vegetal

Foram utilizadas quatro plantas (T1) de milho transformadas com o gene *Alt_{SB}* sob o controle do promotor da ubiquitina e com o terminador NOS, sendo dois eventos obtidos via *Agrobacterium tumefaciens* (A2.17 e A4.13) e dois clones de um mesmo

evento gerado por biobalística (B59.9 e B59.20). O marcador de seleção utilizado no cassete de transformação foi o gene *bar* que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio. O híbrido Hi II não transformado, utilizado como genótipo receptor nos processos de transformação, foi utilizado como controle negativo. O evento A2.22RC1, resultado do primeiro ciclo de retrocruzamento do evento A2.22 com a linhagem L3 foi utilizado como amostra calibradora nas análises. Esse evento já havia sido previamente caracterizado por *Southern Blotting* e pelo teste de progênie e apresenta apenas uma cópia do transgene *Alt_{SB}*.

Extração de DNA

DNA genômico foi extraído de folhas jovens, individualmente coletadas, de acordo com Saghai-Maroo et al. (1984). A integridade e a concentração do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose e por espectrofotometria, respectivamente.

Desenho de primers

Os *primers* para a reação de PCR quantitativo foram desenhados utilizando o software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Como referência de cópia única, foram utilizados os *primers* para o gene que codifica a enzima álcool desidrogenase 1 (*adh1*) de milho *adh1-F*: 5'GTAACATCGTCCAGCACTGCTATT3' e *adh1-R*: 5'TCGTATGATGTGTTTCAGCCAGACT3' proposto por Ingham et al. (2001). Para o transgene, foram desenhados *primers* para o gene *bar*, utilizado como marcador de seleção no cassete de transformação *bar-F*: 5'ACAGCGACCACGCTCTTGA3' e *bar-R*: 5'GCTCTACACCCACCTGCTGA3'.

PCR Quantitativo

Todas as reações de PCR quantitativo foram conduzidas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems,

Foster City, CA) com três réplicas técnicas. Cada reação continha 20 ng de DNA genômico, 1X Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 12 pmols de cada *primer* em um volume final de 20 µL. Além disso, para avaliar a sensibilidade da metodologia, reações contendo 40, 60 e 80 ng de DNA da amostra calibradora foram incluídas nas análises. Essas reações simulam amostras contendo 2, 3 e 4 cópias do transgene. As condições de amplificação foram aquelas sugeridas pelo fabricante.

A eficiência da reação foi calculada por meio de uma curva padrão obtida a partir de diluições seriadas de 1, 1:10, 1:100 e 1:1000 do DNA da amostra calibradora A2.22RC1 baseada na fórmula:

$$E = 10^{(-1/\beta_1)} - 1, \text{ onde:}$$

E = eficiência da reação

β_1 = é o coeficiente de inclinação da reta obtida plotando-se o log da diluição do DNA pelos valores de Ct, que indicam o ciclo da reação de PCR onde o acúmulo de fluorescência atingiu um limiar previamente estabelecido pelo equipamento.

O valor de Ct do gene-alvo é normalizado pelo valor de Ct do gene de referência, com o número de cópias conhecido ($\Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{referência}}$). Pelo fato de o número de cópias do gene de referência permanecer constante, a alteração no valor de ΔCt corresponde a uma variação no número de cópias do gene alvo. Pela comparação do valor de ΔCt de amostras desconhecidas com o ΔCt de uma amostra calibradora, no caso a A2.22RC1, o valor de $\Delta\Delta Ct$ é obtido. Assim, o número de cópias é calculado aplicando-se a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, método de quantificação relativa proposto originalmente por Livak e Schmittgen (2001) para quantificar a expressão de genes.

Resultados

O método de quantificação relativa pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ assume que as eficiências de amplificação do gene de referência e do transgene são semelhantes. Assim, as eficiências de amplificação para ambos os genes, calculadas com base na diluição seriada do DNA do evento A2.22RC1, foram de 95% para o gene *adh1* e de 99% para o *bar* (Figura 1). O coeficiente de correlação entre os valores de Ct e o log da concentração de DNA em torno de 0,99 para ambos os genes, indicando que os valores de Ct são adequados para a estimativa do número de inserções de transgenes pelo método de quantificação relativa (FAIZE et al., 2010).

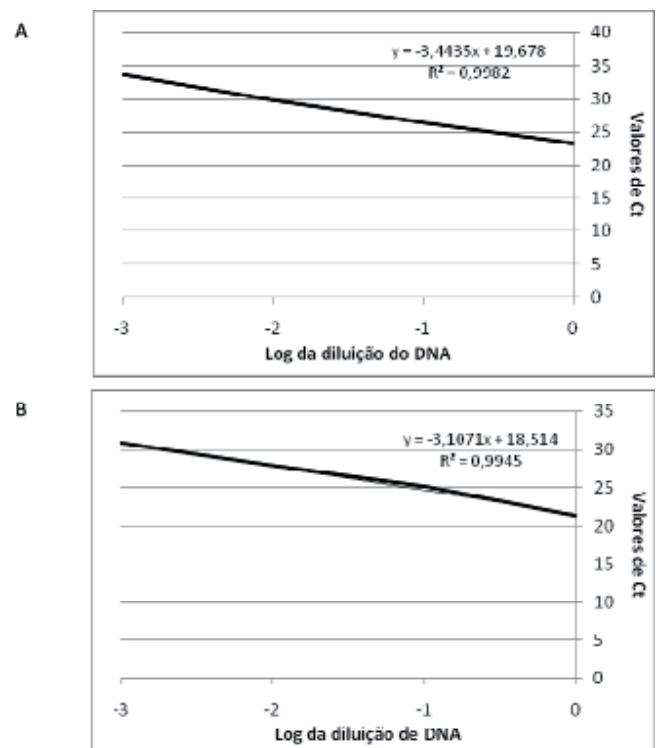


Figura 1. Eficiência de amplificação dos genes *adh1* (A) e *bar* (B). O coeficiente de correlação linear (R^2) e o coeficiente de inclinação da reta estão apresentados no gráfico.

Após a normalização do Ct, o número de cópias do transgene foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, comparando-se cada amostra desconhecida com o DNA do evento A2.22RC1, que continha uma única cópia do transgene. Como esperado, o controle Hi II não transformado não apresentou amplificação para o gene *bar*. Já os clones gerados por meio de biobalística, B59.9 e B59.20, apresentaram acima de quatro inserções do transgene, enquanto os eventos obtidos por transformação utilizando *A. tumefaciens*, A2.17 e A4.13, apresentaram apenas uma cópia (Tabela 1). A metodologia estabelecida também foi capaz de diferenciar amostras que representavam ter 2,3 e 4 inserções (Tabela 2).

A quantificação do número de cópias do transgene proposta no presente trabalho foi comparada com a técnica de *Southern blotting*, previamente realizada para uma caracterização inicial dos transgênicos. Com base nos resultados apresentados na Tabela 1, foi verificado que os eventos contendo uma cópia do transgene foram confirmados por ambas as técnicas moleculares, assim como o controle negativo Hi II, onde não houve amplificação por PCR quantitativo. Já clones gerados por biobalística apresentaram mais de quatro cópias pela técnica de PCR quantitativo e nove cópias por *Southern blotting*. Resultados similares também foram encontrados por Ingham et al. (2001) utilizando o método TaqMan®.

Tabela 1. Estimativas do número de cópias do transgene por qPCR calculado pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dos quatro eventos de milho transgênicos, do evento A2.22RC1 contendo uma única cópia do transgene e do Hi II não transformado, em comparação com os resultados obtidos pelo *Southern blotting*.

Amostras	Ct <i>bar</i>	Ct <i>adh1</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Nº Cópias (qPCR = $2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Nº Cópias (<i>Southern</i>)
A2.22RC1	21,98	22,55	-0,57	0	1,00	1
A2.17	22,30	22,82	-0,52	0,05	0,97	1
A4.13	23,05	23,44	-0,39	0,18	0,90	1
B59.9	19,98	23,04	-3,07	-2,49	5,70	9
B59.20	20,32	23,03	-2,71	-2,13	4,40	9
Hi II	29,34	21,23	8,11	8,04	0,01	0

Tabela 2. Estimativas do número de cópias do transgene por qPCR calculado pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a partir de amostras que representavam ter 1, 2, 3 e 4 inserções.

Amostras	Ct <i>bar</i>	Ct <i>adh1</i>	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Nº Cópias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
A2.22RC1 _{1X}	25,88	26,33	-0,45	0	1,00
A2.22RC1 _{2X}	24,49	26,33	-1,54	-1,10	2,13
A2.22RC1 _{3X}	24,197	26,33	-2,31	-1,68	3,21
A2.22RC1 _{4X}	23,69	26,33	-2,63	-2,18	4,54

Apesar de o PCR quantitativo ser utilizado na determinação do número de cópias de transgenes, é importante ressaltar que todas as referências utilizaram o método TaqMan® (BUBNER; BALDWIN, 2004; AGUILERA et al., 2009; GADALETA et al., 2011). No único relato do uso de qPCR para determinação de número de cópias com SYBR® Green, Song et al. (2002) o fizeram com base em curva padrão. Dessa forma, é a primeira vez que uma metodologia baseada em PCR quantitativo utilizando a fluorescência SYBR® Green e o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é utilizada com confiabilidade e acurácia suficientes para estimar o número de inserções de transgenes em um genoma complexo como o milho. Deve ser ressaltado que a metodologia proposta, foi sensível o suficiente para discriminar simulações de uma, duas, três ou quatro cópias de um gene no genoma, de onde se conclui que a mesma foi capaz de discriminar os eventos que possuíam apenas uma cópia do transgene. As vantagens da metodologia apresentada em comparação com as demais já descritas são a simplicidade e o custo reduzido, viabilizando a análise de um grande número de amostras.

Conclusões e Implicações

Podemos concluir que a metodologia desenvolvida baseada em qPCR combinando o sistema de detecção por SYBR® Green e o método de quantificação relativa por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é confiável para estimar número de inserções presentes em eventos transformados de milho. Tal discriminação já é um grande avanço no processo de caracterização de plantas transgênicas, uma vez que permite uma seleção precoce, em larga escala e com baixo custo dos eventos de maior interesse para as próximas fases da seleção.

Co-autores

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Químico, Doutorando em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG
E-mail: ubiraci@cnpms.embrapa.br

Kátia Ferreira Pôssa

Biotecnóloga, Doutoranda em Biotecnologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG
E-mail: katiapossa@hotmail.com

Luciana C. S. S. Andrade

Graduanda em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM, Sete Lagoas, MG
E-mail: luciana.carla15@hotmail.com

Valdênia L. da Silva

Graduanda em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM, Sete Lagoas, MG
E-mail: valdenialopes@yahoo.com.br

Fernanda A. Lopes

Graduanda em Biomedicina pela Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS Belo Horizonte, MG
E-mail: nandaalopess@hotmail.com

Andréa Almeida Carneiro

Bióloga, Ph. D. em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG
E-mail: andreac@cnpms.embrapa.br

Newton Portilho Carneiro

Biólogo, Ph. D. em Biologia Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG
E-mail: newtonc@cnpms.embrapa.br

Jurandir Vieira de Magalhães

Engenheiro Agrônomo, Ph. D. em Biologia Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG
E-mail: jurandir@cnpms.embrapa.br

Referências

- AGUILERA, M.; QUERCI, M.; PASTOR, S.; BELLOCHI, G.; MILCAMP, A.; EEDE, G. V. Assessing copy number of MON 810 integrations in commercial seed maize varieties by 5' event-specific real-time PCR validated method coupled to $2^{-\Delta\Delta CT}$ analysis. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 73-79, 2009.
- BUBNER, B.; BALDWIN, I. T. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, p. 263-271, 2004.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/index.php>>. Acesso em: nov. 2011.
- FAIZE, M.; FAIZE, L.; BURGOS, L. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. **BMC Biotechnology**, v. 10, p. 53, 2010.
- GADALETA, A.; GIANCASPRO, A.; CARDONE, M. F.; BLANCO, A. Real-time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 16, p. 652-688, 2011.
- INGHAM, D. J.; BEER, S.; MONEY, S.; HANSEN, G. Quantitative real-time assay for determining transgene copy number in transformed plants. **BioTechniques**, v. 31, p. 132-140, 2001.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis de relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Method**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MA, J. F.; PETER, R. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 273-278, 2001.
- MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Austin, v. 167, p. 1905-1914, 2004.
- MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.-H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.
- SONG, P.; CAI, C. Q.; SKOKUT, M.; KOSEGI, B. D.; PETOLINO, J. F. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERS-derived transgenic maize. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, p. 948-954, 2002.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, p. 503-517, 1975.

**Circular
Técnica, 164**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027 1100

Fax: (31) 3027 1188

E-mail: sac@cnpmc.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2011): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

**Comitê de
publicações**

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira.

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida
Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira
Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda
de Castro.

Expediente

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de
Castro.

Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.

Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.